

The material eluted from these zones was analyzed for AMP with the Beckman DU spectrophotometer. The difference between the value obtained for strip 1 (25.3  $\mu\text{g}$ ) and an average of the values obtained for strips 2 and 3 (21.2 and 21.4  $\mu\text{g}$ ) indicates liberation of AMP in the process of formation of *p*-NPS. The presence of AMP in strips 2 and 3 is probably due to decomposition of the "active sulfate" intermediate.

Eluted radioactive "active sulfate" intermediate was tested for phosphorus. A large amount of inorganic phosphorus was found, indicating that under the conditions employed the rate of migration of phosphate was similar to the rate of migration of the intermediate. As the difference between total and inorganic phosphorus was not significant no conclusion can be reached concerning the presence of phosphorus in the compound.

On the basis of our findings, viz. (a) coincidence of ultraviolet absorption and radioactivity (due to incorporated radioactive sulfate) in the zone of paper giving on elution "active sulfate" intermediate, (b) the presence of ribose in a ratio of 1:0.93 to AMP, (c) liberation of AMP in the process of formation of *p*-NPS, in conjunction with the fact that pyrophosphate is liberated in the process of formation of the "active sulfate" as shown by HILZ<sup>5</sup>, the following tentative conclusion seems justifiable. The "active sulfate" is formed from ATP by splitting off pyrophosphate and binding of sulfate to AMP, probably through the phosphoric acid, forming a mixed anhydride. The "active sulfate" reacts with *p*-NP in the presence of transferring enzyme, transferring the sulfate with formation of *p*-NPS and liberation of AMP.

The activation step (formation of "active sulfate" intermediate) is probably the common first step in the biosynthesis of all sulfuric acid esters. Transfer of the sulfate from the "active sulfate" to the substrate (phenols, steroid phenols and alcohols, amino sugar containing substrates, and others) is probably mediated by specific transferring enzymes. An indication of this possibility is presented by HILZ AND LIPMANN<sup>6</sup> with *Neurospora sitophila* and by our findings<sup>7</sup> with the mold *Fusarium solani*, where formation of *p*-NPS was obtained only when the liver transferring enzyme was added to a cell-free preparation of the mold.

From the foregoing observations we may tentatively conclude that the "active sulfate" intermediate is adenylylsulfate.

Our gratitude is expressed to Miss PHYLLIS SMITH and Dr. C. T. LING for the ribose determinations.

Note: A paper by HILZ AND LIPMANN<sup>6</sup> appeared while this work was in progress. Our findings are in agreement with theirs on many points.

Department of Biochemistry, Jefferson Medical College,  
Philadelphia, Pa. (U.S.A.)

R. H. DE MEIO  
MARTHA WIZERKANIUK

<sup>1</sup> S. BERNSTEIN AND R. W. MCGILVER, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 745.

<sup>2</sup> R. H. DE MEIO, MARTHA WIZERKANIUK AND I. SCHREIBMAN, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 439.

<sup>3</sup> D. M. TENNENT, K. FLOREY AND J. B. WHITLA, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 1748.

<sup>4</sup> C. T. LING, personal communication.

<sup>5</sup> H. HILZ, *Federation Proc.*, 14 (1955) 227.

<sup>6</sup> H. HILZ AND F. LIPMANN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 41 (1955) 880.

<sup>7</sup> R. H. DE MEIO, unpublished observations.

Received March 1st, 1956

## Effet du jeûne protéique prolongé sur la répartition des ribonucléotides nucléiques dans diverses fractions cytoplasmiques du foie de rat

Au cours de recherches antérieures<sup>1</sup>, nous avons constaté une réduction de la quantité absolue de l'acide ribonucléique (ARN) du foie de 30 à 50 % à la suite d'un jeûne protéique prolongé (4 à 6 semaines). D'autre part, il s'est avéré que l'activité spécifique du P de l'ARN restant à la suite d'une dénutrition azotée se trouve accrue<sup>2</sup>. Nous nous sommes alors demandés s'il existe une différence de constitution entre l'ensemble de l'ARN du foie normal et celui qui reste à la fin du jeûne. Pour répondre à cette question, nous avons étudié la répartition des nucléotides dans diverses structures du cytoplasme du foie chez des animaux normaux d'une part, chez des animaux ayant perdu 30 à 45 % de leur poids à la suite du jeûne protéique d'autre part.

Les animaux ont été sacrifiés après 18 heures de jeûne total, ce qui entraîne la disparition du glycogène hépatique. Le fractionnement a été effectué dans le saccharose 0.25 M selon DE DUVE<sup>3</sup>. Après sédimentation des noyaux, nous avons séparé les mitochondries lourdes à 30,000 g min<sup>-1</sup>,

\* La notation en g min a été proposée par DE DUVE ET BERTHET<sup>4</sup>.

TABLEAU I

REPARTITION DES NUCLEOTIDES DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES DANS DIVERSES FRACTIONS  
CYTOPLASMIQUES DU FOIE DE RAT

Comparaison entre animaux témoins et animaux ayant subi un jeûne protéique prolongé.  
Valeurs exprimées en molécules pour 100 molécules de nucléotides.

| Mitochondries légères |              |                 |                |                |                | Microsomes       |                |                |                |                |   |
|-----------------------|--------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|
|                       | Nbre<br>Exp. | G               | U              | C              | A              |                  | Nbre<br>Exp.   | G              | U              | C              | A |
| Témoins               | 3            | 31.0<br>± 1.00* | 22.3<br>± 2.54 | 25.4<br>± 3.95 | 21.3<br>± 1.85 | 6                | 30.8<br>± 2.04 | 21.6<br>± 1.59 | 27.7<br>± 1.32 | 20.0<br>± 1.79 |   |
| Jeûneurs              | 3            | 31.0<br>± 1.00  | 22.0<br>± 2.64 | 25.4<br>± 1.63 | 21.6<br>± 1.58 | 5                | 37.0<br>± 2.34 | 19.6<br>± 1.10 | 24.0<br>± 2.54 | 19.4<br>± 1.34 |   |
|                       |              |                 |                |                |                | $p < 0.001^{**}$ |                |                |                |                |   |

  

| Surnageant |              |                |                |                |                |
|------------|--------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|            | Nbre<br>Exp. | G              | U              | C              | A              |
| Témoins    | 6            | 32.2<br>± 1.85 | 22.5<br>± 2.88 | 25.7<br>± 1.41 | 19.7<br>± 1.37 |
| Jeûneurs   | 5            | 30.8<br>± 0.84 | 23.2<br>± 1.30 | 25.0<br>± 1.58 | 21.0<br>± 1.73 |

  

*Abréviations:* Nbre exp.: nombre expériences; G: acide guanylique; U: acide uridylique; C: acide cytidylique; A: acide adénylique.

  

\* Déviation standard:  $s = \sqrt{\frac{\varepsilon(x-\bar{x})^2}{N-1}}$

\*\* La valeur de  $p$  indique le degré de signification de la différence entre témoins et jeûneurs déterminé à l'aide du test "t" de Fisher.

Abréviations: Nbre exp.: nombre expériences; G: acide guanylique; U: acide uridylique; C: acide cytidylique; A: acide adénylique.

$$* \text{ Déviation standard: } s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

\*\* La valeur de  $p$  indique le degré de signification de la différence entre témoins et jeûneurs déterminé à l'aide du test "t" de Fisher.

les mitochondries légères à 250,000 g min et les microsomes à 3,000,000 g min; le surnageant a également été recueilli. La pureté des fractions obtenues a été contrôlée par le dosage d'un enzyme caractéristique: la cytochrome-oxydase pour les mitochondries lourdes, la phosphatase acide pour les mitochondries légères et la glucose-6-phosphatase pour les microsomes<sup>3</sup>. Ensuite, les différentes fractions ont été débarrassées des composés acido-solubles et des lipides et les nucléotides de l'ARN ont été dosés par chromatographie sur papier selon notre technique<sup>4</sup>.

Les résultats de nos essais sont consignés dans le Tableau I.

Il résulte de l'examen de ce tableau qu'il n'y a pas de différences dans la répartition des ribonucléotides des fractions de mitochondries légères et du cytoplasme surnageant entre animaux témoins et jeûneurs. On relève par contre un accroissement notable de l'acide guanylique avec réduction parallèle de l'acide uridylique et cytidylique au niveau des microsomes du foie d'animaux jeûneurs. La différence pour l'acide guanylique est hautement significative (Test de Student-Fisher:  $t = 4.83$ ;  $p < 0.001$ ). On peut en conclure à l'existence d'une différence nette entre l'ARN restant et celui qui quitte les cellules au cours du jeûne protéique.

Les faits exposés apportent également une nouvelle preuve *in vivo* de l'existence de divers types d'ARN à côté de la démonstration fournie d'une différence de constitution entre l'ARN du noyau et du cytoplasme<sup>5-7</sup>.

Les quantités faibles de mitochondries lourdes dont nous disposions n'ont pas permis une comparaison exempte de critiques. Les résultats d'expériences nouvelles seront rapportés ultérieurement.

Institut de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Strasbourg (France)

J. D. WEILL  
M. LEDIG  
P. MANDEL

<sup>1</sup> P. MANDEL, M. JACOB ET L. MANDEL, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 80.

<sup>2</sup> M. JACOB, *Thèse Doctorat ès-Sciences*, Strasbourg, 1953.

<sup>3</sup> C. DE DUVE, B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX ET F. APPELMANS, *Biochem. J.*, 60 (1955) 604.

<sup>4</sup> C. DE DUVE ET J. BERTHET, *Nature*, 172 (1953) 1142.

<sup>5</sup> P. MANDEL, J. D. WEILL ET M. LEDIG, *Bull. soc. chim. biol.*, (sous presse).

<sup>6</sup> D. ELSON, L. W. TRENT ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 17 (1955) 362.

<sup>7</sup> G. W. CROSBIE, R. M. S. SMELLIE ET J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.*, 54 (1953) 287.

Reçu le 22 février 1956